

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001880

International filing date: 09 February 2005 (09.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-033810
Filing date: 10 February 2004 (10.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 31 March 2005 (31.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

09. 2. 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 2 月 1 0 日
Date of Application:

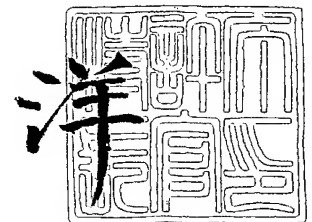
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 3 3 8 1 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 3 3 8 1 0]

出 願 人 学 校 法 人 日 本 大 学
Applicant(s):

2 0 0 5 年 3 月 1 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P-NU005
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07H 21/00
C07K 14/00

【発明者】
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
【氏名】 加納 壘

【発明者】
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
【氏名】 長谷川 篤彦

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区柿の木台 2 7 - 1 1
【氏名】 井上 知香

【特許出願人】
【識別番号】 899000057
【氏名又は名称】 学校法人 日本大学

【代理人】
【識別番号】 100090941
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤野 清也

【選任した代理人】
【識別番号】 100076244
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤野 清規

【選任した代理人】
【識別番号】 100113837
【弁理士】
【氏名又は名称】 吉見 京子

【選任した代理人】
【識別番号】 100127421
【弁理士】
【氏名又は名称】 後藤 さなえ

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 014834
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

配列表配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するイヌCD20蛋白質。

【請求項 2】

配列表配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に 7 0 % 以上の相同性を有する蛋白質。

【請求項 3】

配列表配列番号 1 に記載のアミノ酸配列に 8 0 % 以上の相同性を有する蛋白質。

【請求項 4】

配列表配列番号 2 に記載のイヌCD20をコードするDNA。

【請求項 5】

配列表配列番号 2 に記載のDNA配列に 7 0 % 以上の相同性を有するヌクレオチド。

【請求項 6】

配列表配列番号 2 に記載のDNA配列に 8 0 % 以上の相同性を有するヌクレオチド。

【請求項 7】

配列表配列番号 3 に記載のイヌCD20をコードするRNA。

【請求項 8】

配列表配列番号 3 に記載のRNA配列に 7 0 % 以上の相同性を有するヌクレオチド。

【請求項 9】

配列表配列番号 3 に記載のRNA配列に 8 0 % 以上の相同性を有するヌクレオチド。

【請求項 1 0】

請求項 4 に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド。

【請求項 1 1】

請求項 5 または 6 に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド。

【請求項 1 2】

請求項 7 に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド。

【請求項 1 3】

請求項 8 または 9 に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド。

【請求項 1 4】

請求項 1 0 または 1 1 に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 または 1 3 に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体。

【書類名】明細書

【発明の名称】イヌCD20遺伝子

【技術分野】

【0001】

本発明は、悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発に用いるイヌのCD20遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

悪性リンパ腫とは、生体内のリンパ組織が腫瘍化したものを言う。人間の悪性リンパ腫は、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に分けられ、非ホジキンリンパ腫はその由来によって、Tリンパ球由来、NK細胞由来やBリンパ球由来のリンパ腫がある。これらは、悪性化の進行の度合いに応じて、低悪性度リンパ腫、中悪性度リンパ腫、高悪性度リンパ腫に分けられる。

日本人では、悪性リンパ腫患者の大半が非ホジキンリンパ腫である。これはリンパ節に発生することが多いが、皮膚、脳、眼、鼻腔、副鼻腔、扁桃、咽頭、唾液腺、甲状腺、乳腺、肺、縦隔、胸膜、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、精巣、卵巣、骨など、リンパ組織が存在する全身に発生し、組織ごとに症状が異なる。

【0003】

悪性リンパ腫は、イヌ等に多く認められる腫瘍の一つで、イヌにおいては体中のリンパ節が腫れる多中心型リンパ腫が多い。多中心型リンパ腫が悪性化すると、リンパ組織を介して肺や肝臓、脾臓、骨髄に転移し、黄疸や貧血などの症状を示す。

また、胸腺のリンパ節が腫れて胸腔内に水が溜まる胸腺型リンパ腫や、消化器のリンパ組織が腫瘍化する消化器型リンパ腫などもある。これらの悪性リンパ腫は進行が早く、イヌ等の患畜において、無治療の場合であると、発見後平均して100日前後で死に至る。従って、早期の発見とともに、発見後の適切な治療が望まれている。

【0004】

悪性リンパ腫の治療法として、放射線療法、外科療法などの複数の治療法があるが、従来は、放射線療法と化学療法が主体的に行われている。

放射線療法は悪性リンパ腫の病変部位が数箇所である場合に多く用いられる。腫瘍細胞に対し放射線を照射して、病変部位をピンポイントに死滅させる治療法であり、早期の腫瘍除去には最適な治療法であるが、皮膚障害や粘膜障害、肺障害の副作用がある。

【0005】

化学療法はリンパ組織や臓器、骨髄や血液などの全身に腫瘍細胞が広がっている場合に多く用いられる。腫瘍細胞に対し細胞毒性を有する抗がん剤を投与して、全身の病変部位を死滅させる治療法であり、悪性リンパ腫における唯一の全身療法である。

人間の悪性リンパ腫において、シクロホスファミド、アドリマイシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンの抗がん剤を組み合わせ用いたCHOP（チョップ）療法が標準的になされる。また、イヌの悪性リンパ腫において、シクロホスファミド、ビンクリスチン、シトシンアラビノシド、プレドニゾロンの抗がん剤を組み合わせ用いたCOAP計画等がなされる（非特許文献1）。

【0006】

これらの抗がん剤は、すべての細胞を破壊する細胞毒であり、正常細胞にも影響を及ぼすが、腫瘍細胞が正常細胞より成長が早い為、腫瘍細胞の方が障害を受けやすいという性質を利用して用いられている。

しかし、これらの抗がん剤は、細胞分裂が早い正常細胞、例えば血液細胞、毛根細胞、消化管の細胞、生殖細胞などに対して、腫瘍細胞と同様に傷害してしまうため、白血球の減少、脱毛、吐き気などの副作用が起こる。

【0007】

放射線療法、化学療法等は現在、主として行われている治療法であるにもかかわらず、生体内に及ぼす副作用が強く、また治療によっていったん寛解しても再発することが多々

あるため、必ずしも完治できる治療法とはいえない。

また、治療法の実施には多額の費用が必要となる。人間のみならず、イヌ（30～32 kg）の治療においても米国の統計では、約1,500～1,800ドルの費用がかかり、必ずしも安価とはいえない。そこで、このような問題を解決するために、安全性が高く、完治につながり、かつ安価に実施できる悪性リンパ腫の治療法が求められている。

【0008】

化学療法は、使用する抗がん剤がすべての細胞を攻撃する細胞毒である点に問題があるといえる。そこで、標的となる腫瘍細胞のみを特異的に攻撃できる、モノクローナル抗体療法が近年注目されている（非特許文献2）。

これは、標的となる腫瘍細胞に特異的に発現する抗原を利用し、その抗原に特異的な抗体を用いて腫瘍細胞を特定することで、腫瘍細胞に集中的に薬剤が集まるようにする治療法である。

人間の悪性リンパ腫におけるこの治療法の対象として、Bリンパ球の細胞表面に特異的に発現し、悪性リンパ腫に高レベルで発現するCD20抗原を利用し、これを特異的に認識する抗CD20抗体を用いる方法が開発された。

【0009】

抗CD20抗体は、腫瘍細胞のCD20抗原と結合すると、抗体や補体を介する免疫反応が起こり、腫瘍細胞を傷害する。従来の抗がん剤とは作用機序が異なり、標的となる腫瘍細胞のみに働くため、細胞表面にCD20抗原が発現しない造血幹細胞等に影響を与えない。実際、副作用は過敏症、アレルギー症状と類似した病状のみで、抗がん剤のような、脱毛、吐き気などはほとんど起こらないことがわかっている。

抗CD20抗体は、ヒト由来のマウス／ヒトキメラ型抗体として、調整され、CD20陽性の低悪性度、または濾胞型B細胞性非ホジキンリンパ腫に対し、2001年に日本において保険適応となった。商品名リツキサン（rituxan）、一般名リツキシマブ（rituximab）という薬で全薬工業株式会社が発売している。このように治療効果が優れ、副作用の少ない抗体療法は、悪性リンパ腫の治療法を大きく変えるものとして期待されている。

【0010】

人間において、このように有用な治療法が確立されたにもかかわらず、イヌ等の患畜において、抗体療法はいまだ行われていない。一方、悪性リンパ腫の患畜は多く、抗体療法の確立が強く望まれている。そこで、本発明者らは抗体療法の確立において必須とされるイヌのCD20遺伝子配列を本発明にて明らかにした。本発明で明らかにしたイヌのCD20遺伝子配列はイヌの抗CD20抗体の作成に必須であり、イヌの悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発に用いうる。

【非特許文献1】長谷川篤彦 辻本元 総監訳、「猫と犬のリンパ腫」、スモールアニマルインターナルメディシン、P. 1127-1137

【非特許文献2】造血幹細胞移植の適応ガイドライン 日本造血細胞移植学会2002. 4

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、イヌの抗CD20抗体の作成に必須であるイヌのCD20遺伝子配列を明らかにすることを課題とする。

すなわち、本発明は、（1）配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有するイヌCD20蛋白質、（2）配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列に70%以上の相同性を有する蛋白質、（3）配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列に80%以上の相同性を有する蛋白質、（4）配列表配列番号2記載のイヌCD20をコードするDNA、（5）配列表配列番号2に記載のDNA配列に70%以上の相同性を有するヌクレオチド、（6）配列表配列番号2に記載のDNA配列に80%以上の相同性を有するヌクレオチド、（7）配列表配列番号3記載のイヌCD20をコードするRNA、（8）配列表配列番号3に記載

載のRNA配列に70%以上の相同性を有するヌクレオチド、(9)配列表配列番号3に記載のRNA配列に80%以上の相同性を有するヌクレオチド、(10)(4)に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド、(11)(5)または(6)に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド、(12)(7)に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド、(13)(8)または(9)に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド、(14)(10)または(11)に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体、(15)(12)または(13)に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体に関する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、上記課題を鋭意検討した結果、イヌの血液中の単核球を試料として遺伝子を単離し、イヌのCD20遺伝子を精製し、この配列を明らかにした。当該イヌのCD20遺伝子はヒトのCD20遺伝子と81.0%の高い相同性を有し、またマウスのCD20遺伝子とも71.8%の相同性を有することが明らかにされた。また、これらの遺伝子配列によってコードされるCD20のアミノ酸配列は、ヒトのCD20のアミノ酸配列と72.8%の高い相同性を有し、マウスのCD20のアミノ酸配列とも68.2%の相同性を有することが明らかにされた。

また、CD20は細胞の膜外に発現し、抗原として認識されることから、本発明にて解明されたCD20の膜外領域のアミノ酸配列とヒトCD20の膜外領域のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、66.6%であった。これらから当該イヌのCD20遺伝子は抗CD20抗体作成に有用であることが示唆された。

従って、本発明によって明らかにされたアミノ酸配列、DNA配列、RNA配列と70%以上または80%以上の相同性をもつ配列も有効と考えられ、この範囲内であれば、1またはそれ以上のアミノ酸または塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入されているものも含まれる。

【発明の効果】

【0013】

本発明により明らかにされたイヌのCD20遺伝子配列は、イヌの抗CD20抗体作成に必須である。本発明のイヌのCD20遺伝子配列は、イヌの悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発に用いうる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の目的であるCD20遺伝子配列の決定において、PCR法を用いるにあたり、試料の精度と使用するプライマーの設計が重要となる。mRNAの抽出などには市販のキットを用いることもできる。

以下に、本発明を具現化した実施例を示すが、本発明はいかなる場合でもこのような実施例に限定して解釈されるものではない。

【実施例1】

【0015】

試料の調製

(1) 単核球の分離

正常イヌ1頭より採取した血液(5ml)をヘパリンで抗凝固処理し、それにヘパリン加生理食塩水(5ml)を加え、転倒混和した(総量10ml)。遠心沈殿管に5mlのLymphoprepを入れ、その上に試料を重層し、遠心分離機にて室温で800×gで遠心することで単核球を分離した。単核球の分離にはLymphoprep(Axis-Shield Pos AS)を用いた。

(2) RNA抽出

得られた単核球に、グアニジン塩を含んだBuffer RLT(β -メルカプトエタノール加)を加え細胞溶解させた。QIAshredderスピンカラムに添加した後、1000×gで2分間遠心し、ホモジナイズした(QIAshredder、QIAGEN

N)。70%エタノールを添加しピペッティングした後、RNeasyミニスピカラムにアプライし、8000×gで15秒遠心した後、フロースルーを捨てた。RNAはRNeasyミニスピカラムのシリカゲルメンブレンに吸着した。

次にBuffer RW1をRNeasyカラムに添加し、5分間室温でインキュベートした後、8000×gで15秒遠心し、フロースルーを捨てた。RNeasyカラムへBuffer RPEをアプライした後、8000×gで15秒遠心した。これを2回繰り返すことで不純物を取り除いた。

最後にRNase free waterを適量加え、8000×gで1分遠心することでRNAを溶出させた。RNAの抽出にはキット (RNeasy Mini Kit、QIAGEN) を用いた。

(3) DNase処理

得られたRNAに微量のゲノムDNAが混入することを避けるため、次のDNase処理によりゲノムDNAを取り除いた。

キットに付属のBufferとDNaseIをRNA溶液に加え、37℃で30分間インキュベートした。DNase Inactivation Reagentをさらに混ぜあわせ、室温で2分間インキュベートした。8000×gで1分遠心し、上清を新しいチューブに移し、DNA-freeのRNA溶液とした。DNase処理にはキット (DNA-free, Ambion) を用いた。

(4) cDNA合成

DNase処理したRNA溶液に、10×Buffer RT、dNTP Mix、RT (逆転写酵素)、Ribonuclease Inhibitor cloned (Invitrogen)、配列表配列番号6に示した配列を有するoligo dT primer (プロリゴ・ジャパン) を加え37℃で1時間インキュベートすることでcDNAを合成した。

cDNAの合成にはキット (OmniScript, QIAGEN) を用いた。

【実施例2】

【0016】

イヌCD20遺伝子断片のクローニング

ヒト・マウスのCD20遺伝子の塩基配列を基に相同性の高い領域から配列表配列番号7に示した配列を有するSense primer及び配列表配列番号8に示した配列を有するReverse primerを設計し、合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った (TaKaRa Taq、TaKaRa)。

キット中の耐熱性DNA polymerase (rTaq) を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、53~60℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でPCRを行い、CD20遺伝子断片を増幅した。その後PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

(2) TA cloning・Transformation

このCD20遺伝子断片をプラスミドベクター (pCR vector) に組み込み、大腸菌に形質転換した後 (TA Cloning Kit、Invitrogen)、アンプシリン・X-gal添加LB培地にて大腸菌を増殖させた。

増殖した大腸菌が目的の遺伝子断片を含むプラスミドDNAを持っているか、ボイル法を用いて確認した。大腸菌からのプラスミド抽出にはキット (BioRad plasmid kit, BioRad) を用いた。

【実施例3】

【0017】

イヌCD20遺伝子断片の塩基配列の決定

シーケンス

得られたプラスミドを鋳型とし、使用したpCR vectorに特異的な配列配列番号9に示した配列を有するM13 Forward (-21) primer 及び配列表配列番号10に示した配列を有するM13 Reverse primerを用いてサイ

クルシーケンス反応を行った。反応にはサーマルサイクラーを用い、96℃10秒・50℃5秒・60℃4分を25 cycle繰り返した。反応液の調製にはキット (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) を用いた。キット中の Terminator Ready Reaction MixにはDNA polymeraseの他、蛍光色素で標識されたジデオキシリボヌクレオシド 3リン酸 (ddNTP) があらかじめ混合されているものを用いた。

反応終了後のシーケンス産物をEthanol/EDTA沈殿法にて精製し、未反応の蛍光物質を除去した。これをTemplate Suppression Reagent (TSR) に溶解し、シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) にて塩基配列を解析した。

【実施例4】

【0018】

全イヌCD20遺伝子塩基配列の決定

CD20遺伝子cDNAの全長を解析するため、一部解析した塩基配列より新たなprimerを設計し、3'-および5'-RACE PCR (5' RACE System of Rapid Amplification of cDNA Ends version 2.0/3' RACE System of Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen) を行った。

(1) 3' RACE法

1) cDNA合成

RNA溶液に配列表配列番号11に示した配列を有するAdaptor Primerを混合し、70℃で10分インキュベートした。氷上に3分静置後、Buffer・0.1M DTT・10 mM dNTPを加えて混合し、37℃、2分加温した。

次に逆転写酵素 (SuperScript II Reverse Transcriptase) を加えて混合し、42℃1時間反応させ、cDNAを合成した。

2) PCR

配列表配列番号12に示した配列を有するSense primer (GSP1) 及び配列表配列番号13に示した配列を有するReverse primer (Universal Amplification Primer:キット中) を用い、耐熱性DNA polymerase (rTaq) を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、54℃・1分、72℃・2分を35 cycleの条件でFirst PCRを行った。次にFirst PCR産物を鋳型にした反応液を調製し、配列表配列番号14に示した配列を有するSense primer (GSP2) 及び配列表配列番号13に示した配列を有するReverse primer (Universal Amplification Primer:キット中) を用い、94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、55℃・1分、72℃・2分を35 cycleの条件でnested PCR (Second PCR) を行うことで、CD20遺伝子断片を増幅した。

rTaq (TaKaRa Taq, TaKaRa) 以外の試薬は3' RACE法のキット中のものを使用した。その後PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

【0019】

(2) 5' RACE法

1) cDNA合成

RNA溶液に配列表配列番号15に示した配列を有するSense primer (GSP1) を加え、70℃10分インキュベートした。氷上に1分静置後、Buffer、MgCl₂、DTT、dNTP、逆転写酵素 (SuperScript II Reverse Transcriptase) を加え、42℃1時間インキュベートした。70℃15分加温しReverse Transcriptaseを失活させた。RN

ase Mix を加えませ、37℃30分加温することでRNAを分解した。

2) DNA精製

cDNA反応液にbinding solutionを加え混合し、spin cartridgeに移した。1000×gで2分間遠心し、フロースルーを捨てた。Wash Buffer を加え、1000×gで2分間遠心しフロースルーを捨てた。spin cartridgeを新しいチューブに移し、65℃の滅菌水を加え1分間室温でインキュベートした後、14000rpmで1分間遠心し、液を回収した。

3) TdTによるホモポリマーの付加

滅菌水、Buffer、MgCl₂、dCTP、cDNAを混ぜ、94℃1～2分加温し、氷上で1分おき、TdTを加えませ、37℃10分、65℃10分インキュベートした。

4) PCR

配列表配列番号16に示した配列を有するSense primer (GSP2) 及び配列表配列番号17に示した配列を有するReverse primer (Anchor Primer:キット中)を用い、耐熱性DNA polymerase (rTaq)を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、50℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でFirst PCRを行った。次にFirst PCR産物をtempleteにした反応液を調整し、配列表配列番号18に示した配列を有するSense primer (GSP3) 及び配列表配列番号13に示した配列を有するReverse primer (Universal Amplification Primer:キット中)を用い、94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、58℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でnested PCR (Second PCR)を行うことで、CD20遺伝子断片を増幅した。rTaq (TaKaRa Taq、TaKaRa) 以外の試薬の調整は5' RACE法のキット中のものを使用した。その後PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

【実施例5】

【0020】

イヌCD20遺伝子の同定法について

解析した遺伝子の塩基配列と、ヒト・マウスの遺伝子との相同性を確認した。Genbankに登録されているヒトCD20ゲノム(エキソン)との相同性が81.0%、マウスCD20 mRNAとは71.8%と高い相同性を示したため、今回解析した遺伝子はイヌのCD20であると判断した。イヌのCD20のDNA配列は配列表配列番号3に示し、イヌのCD20のRNA配列は配列表配列番号4に示した。

【実施例6】

【0021】

アミノ酸配列の同定方法について

解析した遺伝子の塩基配列より、CD20のアミノ酸配列を同定した。同定したイヌのCD20アミノ酸配列は配列表配列番号1に示した。

このアミノ酸配列とヒト・マウスの遺伝子との相同性を確認した。Genbankに登録されているヒトCD20のアミノ酸配列との相同性が72.8%、マウスでは68.2%と高い相同性を示したため、今回解析した遺伝子はイヌのCD20であると判断できた。

【0022】

またヒトCD20の膜外領域のアミノ酸配列とそれに相当すると考えられるイヌCD20のアミノ酸配列の相同性は66.6%であった。CD20の膜外領域の配列は配列表配列番号2に示し、DNA配列は配列表配列番号5に示した。

【産業上の利用可能性】

【0023】

本発明により明らかにされたイヌのCD20遺伝子配列は、イヌの悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発において有用である。さらに詳しくは該遺伝子配列よりイヌの抗CD

2 0 抗体作成し、新規なイヌの悪性リンパ腫の治療薬や診断薬、またはそれらを用いる器具等の開発に役立つ。

【配列表】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nihon University

<120> The CD20 gene of dog

<160> 5

<210> 1

<211> 297

<212> PRT

<213> Dog

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 1

```

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Met Ser Gly Thr Leu Pro Val Asp Pro
1           5           10           15
Met Lys Ser Pro Thr Ala Met Tyr Pro Val Gln Lys Ile Ile Pro Lys
          20           25           30
Arg Met Pro Ser Val Val Gly Pro Thr Gln Asn Phe Phe Met Arg Glu
          35           40           45
Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
50           55           60
Ala Leu Gly Ser Leu Leu Met Ile His Thr Asp Val Cys Ala Pro Ile
65           70           75           80
Cys Ile Thr Met Trp Tyr Pro Leu Trp Gly Gly Ile Met Phe Ile Ile
          85           90           95
Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Ala Asp Lys Asn Pro Arg Lys Ser Leu
          100          105          110
Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile
          115          120          125
Ser Gly Ile Ile Phe Leu Ile Met Asp Ile Phe Asn Ile Thr Ile Ser
          130          135          140
His Phe Phe Lys Met Glu Asn Leu Asn Leu Ile Lys Ala Pro Met Pro
145          150          155          160
Tyr Val Asp Ile His Asn Cys Asp Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn
          165          170          175
Ser Leu Ser Ile Gln Tyr Cys Gly Ser Ile Arg Ser Val Phe Leu Gly
          180          185          190
Val Phe Ala Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Lys Leu Val Thr
          195          200          205
Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Lys Leu Cys Ser Lys Pro Lys
          210          215          220
Ser Asp Val Val Val Leu Leu Ala Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Pro
225          230          235          240
Ile Glu Thr Thr Glu Glu Met Val Glu Leu Thr Glu Ile Ile Ala Ser
          245          250          255
Gln Pro Lys Lys Glu Glu Asp Ile Glu Ile Pro Val Gln Glu Glu Glu
          260          265          270
Gly Glu Leu Glu Ile Asn Phe Ala Glu Pro Pro Gln Glu Gln Glu Ser
          275          280          285

```

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ile Pro
290 295

<210> 2

<211> 44

<212> PRT

<213> Dog

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 2

Thr Ile Ser His Phe Phe Lys Met Glu Asn Leu Asn Leu Ile Lys Ala
1 5 10 15
Pro Met Pro Tyr Val Asp Ile His Asn Cys Asp Pro Ala Asn Pro Ser
20 25 30
Glu Lys Asn Ser Leu Ser Ile Gln Tyr Cys Gly Ser
35 40

<210> 3

<211> 1238

<212> DNA

<213> Dog

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 3

atcagccact cgccctaagg ccacagacac tcaggagtgc agagggtgag atgacaacac 60
ccagaaattc aatgagtgga accctcccgg tagatcctat gaaaagccct actgccatgt 120
atcctgttca aaaaataatt cccaaaagga tgccttcagt ggtgggcccct acacaaaact 180
tcttcatgag ggaatctaag acactggggg ctgtccagat tatgaatggg ctcttccaca 240
ttgccctagg cagcctcctg atgattcaca cggatgtctg tgcgcccac tgtataacta 300
tgtggtaccc tctctgggga ggcattatgt tcatcatttc tggatcactc ctggcagcag 360
cggacaaaaa ccccaggaag agtttgggtca aaggaaaaat gataatgaac tcattgagcc 420
tctttgctgc catttctgga ataatttttt tgatcatgga catatttaat attaccattt 480
cccatttttt taaaatggag aatttgaatc ttattaaagc tcccatgcca tatgttgaca 540
tacacaactg tgacccagct aaccctctg agaaaaactc tttatctata caatattgtg 600
gcagcatacg atctgttttc ttgggcggtt ttgctgtgat gctgatcttt gccttcttcc 660
agaaacttgt gacagctggc attgttgaga atgaatggaa aaaactgtgc tctaaaccta 720
aatctgatgt agttgttctg ttagctgctg aagaaaaaaa agaacagccg attgaaacaa 780
cagaagaaat ggttgagctg actgaaatag cttcccaacc aaagaaagaa gaagacattg 840
aaattattcc agtccaagaa gaagaagggg aactggaaat aaactttgca gaacctcccc 900
aggagcagga atcttcacca atagaaaacg acagcatccc ttaagtaacg tttttctttc 960
tgtttccttt tcttaggcgt tagtgttcac agctttcaag agacatatcc acccctgttt 1020
cctgaggccc cctgcagggt ggcctcctcc atgtgtctct ctggcctttg catggagtga 1080
ccacagctcg cttgcgctag ctgcgtctct ttctctcatg cagaggatgc agccattgca 1140
ggaggctaag tcgggcagct tatttacatt acagcaaggc agactgtaat ttctcactaa 1200
acttttccct ggataaagct taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1238

<210> 4

<211> 1238

<212> RNA

<213> Dog

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 4

```
aucagccacu cgcccuaagg ccacagacac ucaggaguuc agagggugag augacaacac 60
ccagaaauuc aaugagugga acccucccgg uagauccuau gaaaagcccu acugccaugu 120
auccuguuca aaaaauaauu cccaaaagga ugccuucagu ggugggcccu acacaaaacu 180
ucuucaugag ggaaucauag acacuggggg cuguccagau uaugaauaggg cucuuccaca 240
uugcccuagg cagccuccug augauucaca cggaugucug ugcgcccac aucguauaacua 300
ugugguaccc ucucugggga ggcuuuauu ucaucauuuc uggaucacuc cuggcagcag 360
cggacaaaaa ccccaggaag aguuugguca aaggaaaaau gauaauaac ucauugagcc 420
ucuuugcugc cauucugga auauuuuuu ugaucaugga cauauuuau auuaccuuu 480
cccauuuuu uaaaauaggag auuuugauc uuauuaaagc ucccaugcca uauugugaca 540
uacacaacug ugaccagcu aaccuccug agaaaaacuc uuuaucuaa caauauugug 600
gcagcauacg aucuguuuu uugggcguu uugcugugau gcugaucuuu gccuucucc 660
agaaacuugu gacagcuggc auuguugaga augaauaggaa aaaacugugc ucuaaaccua 720
aaucugaugu aguuguucug uuagcugcug aagaaaaaa agaacagccg auugaaaca 780
cagaagaaau gguugagcug acugaaauag cuucccaacc aaagaaagaa gaagacauug 840
aaaauauucc aguccaagaa gaagaagggg aacuggaaau aaacuugca gaaccucccc 900
aggagcagga aucuucacca auagaaaacg acagcauccc uuaaguaacg uuuuucuuu 960
uguuuccuuu ucuuaggcgu uaguguucac agcuuucag agacauauc accccuguuu 1020
ccugaggccc ccugcaggug ggccuccucc augugucucu cuggccuuug cauggaguga 1080
ccacagcucg cuugcgcuag cucgcucucu uucucucaug cagaggaugc agccauugca 1140
ggaggcuaag ucgggcagcu uauuuacauu acagcaaggc agacuguaau uucucacuaa 1200
acuuuucccu ggauaaagcu uaaaaaaaaa aaaaaaaa 1238
```

<210> 5

<211> 132

<212> DNA

<213> Dog

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 5

```
accatttccc atttttttaa aatggagaat ttgaatctta ttaaagctcc catgccatat 60
gttgacatac acaactgtga cccagctaac ccctctgaga aaaactcttt atctatacaa 120
tattgtggca gc 132
```

<210> 6

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 6

```
agagagagag agaactagtc tcgagttttt ttttttttt ttt 43
```

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 7

ctcttttgctg ccatttctgg aat 23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 8

tggaagaagg caaagatcag cat 23

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 9

tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 10

caggaaacag ctatgac 17

<210> 11

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 11

ggccacgcgt cgactagtac tttttttttt ttttttt 37

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 12

ctcttttgctg ccatttctgg aat 23

<210> 13

<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221>
<222> (2)..(12)
<223> Universal Amplification Primer
<400> 13
cuacuacuac uaggccacgc gtcgactagt ac 32

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.
<400> 14
gtgatgctga tctttgcctt 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.
<400> 15
ctggaagaag gcagagatca 20

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.
<400> 16
tggaagaagg caaagatcag cat 23

<210> 17
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> i
<222> (36)..(47)
<223> Anchor Primer
<400> 17
cuacuacuac uaggccacgc gtcgactagt acgggnnggg nngggng 48

<210> 18
<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Inventor: Kano, Rui; Inoue, Chika.

<400> 18

ccagaaatgg cagcaaaga 19

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、動物の悪性リンパ腫の治療に有用な抗CD20抗体の作成において、必須であるCD20アミノ酸配列および遺伝子配列を明らかにすることを課題とする。

【解決手段】 イヌの血液中の単核球を試料としてmRNAを得て、イヌCD20遺伝子全塩基配列（配列番号2）を決定した。その配列に基づき、アミノ酸配列（配列番号1）を決定した。ヒト、マウスのCD20遺伝子及びアミノ酸配列と相同性を比較し、イヌCD20遺伝子として同定した。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 3 3 8 1 0
受付番号	5 0 4 0 0 2 1 8 5 1 1
書類名	特許願
担当官	神田 美恵 7 3 9 7
作成日	平成 1 6 年 2 月 1 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成 16 年 2 月 10 日

特願 2 0 0 4 - 0 3 3 8 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 9 9 0 0 0 0 5 7]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 9 月 1 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号

氏 名

学校法人日本大学